



Luiz Roberto Lopes de S. Thiago
Gustavo Eugênio Gerhard Barrocas

Técnica de Produção de Gás:

Adaptações ao método proposto pelo
IGER, UK

Embrapa

do de Corte

TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GÁS: ADAPTAÇÕES AO MÉTODO PROPOSTO PELO IGER, UK

*Luiz Roberto Lopes de S. Thiago
Gustavo Eugênio Gerhard Barrocas*

Campo Grande, MS
1998



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte
Ministério da Agricultura e do Abastecimento***

EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 73

Tiragem: 500 exemplares

COMITÊ DE PUBLICAÇÕES

Cacilda Borges do Valle

Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima – Coordenação Editorial

Jairo Mendes Vieira

Kepler Euclides Filho – Presidente

Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra – Normalização

Maria Isabel de Oliveira Penteado – Secretária Executiva

Rafael Geraldo de Oliveira Alves

Raul Henrique Kessler

Ronaldo de Oliveira Encarnação

Capa: Walter Luiz Iorio

ISBN 85-297-0044-9

ISSN 0100-9443

THIAGO, L.R.L. de S.; BARROCAS, G.E.G. **Técnica de produção de gás: adaptações ao método proposto pelo IGER, UK.** Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 18p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 73).

1. Ruminante. 2. Alimento - Método de avaliação. 3. Alimento - Gás. I. Barrocas, G.E.G. II. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (Campo Grande, MS). III. Título. IV. Série.

CDD 636.0855

© EMBRAPA 1998

Todas as propagandas veiculadas nesta publicação são de inteira responsabilidade dos respectivos anunciantes.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	5
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 O MÉTODO DO IGER.....	7
3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	8
4 REAGENTES.....	8
4.1 Preparo do meio de digestão	8
4.2 Preparo das soluções	9
4.3 Preparo do agente redutor.....	9
4.4 Preparo do inóculo de rúmen	10
4.5 Marcha analítica	10
4.6 Medidas da pressão	11
5 CÁLCULOS	12
6 RESULTADOS	14
7 COMENTÁRIOS FINAIS	16
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GÁS: ADAPTAÇÕES AO MÉTODO PROPOSTO PELO IGER, UK

Luiz Roberto Lopes de S. Thiago¹
Gustavo Eugênio Gerhard Barrocas²

Resumo – O objetivo deste trabalho foi validar o método de avaliação de alimentos para ruminantes, como proposto pelo "Institute of Grassland and Environmental Research" (IGER). Este método é baseado na acumulação de produtos da digestão (gás) em garrafas fechadas de volume fixo, e seu volume calculado em função de variações na pressão interna dessas garrafas. Resultados mostraram que esta técnica é bastante simples, confiável e de custo relativamente baixo.

Abstract – The objective of this work was to validate a method for ruminant feed evaluation, as proposed by the Institute of Grassland and Environmental Research (IGER). This method is based on the accumulation of fermentation products (gas) in a fixed volume container and the volume is calculated from internal pressure changes. Results indicated this to be a simple, reliable and inexpensive technique.

¹ Eng.-Agr., Ph.D., CREA Nº 852/D-Visto 1522/MS, EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS.

² Químico, CRQ Nº 02100222, EMBRAPA-CNPGC.

1 INTRODUÇÃO

A base de alimentação para bovinos no Brasil é a pastagem. Nesta condição, um nível ótimo de produção somente será alcançado quando a disponibilidade de nutrientes na matéria seca ingerida for capaz de suprir a demanda nutricional dos animais em pastejo. Fatores climáticos e edáficos interagem e afetam a qualidade da forrageira, que, por sua vez, influencia o processo de degradação ruminal. O conhecimento dessas interações é importante para se otimizar o desempenho animal. Existem muitos métodos disponíveis para se medir qualidade da dieta de cada um com suas possibilidades e problemas. Dentre estes, está o método da produção de gás (Menke et al., 1979; Pell & Schofield, 1993; Theodorou et al., 1993; Cone et al., 1995), o qual, basicamente, mede esta produção a partir da fermentação de uma amostra em líquido ruminal tamponado.

O método inicial proposto por Menke et al. (1979) consiste na medida direta do volume de gás sob condições normais de pressão atmosférica, e exige atenção contínua do laboratorista. Entretanto, nos outros três métodos citados, o gás produzido é acumulado em garrafas de volume fixo e o volume determinado em função de variações na pressão. Os métodos propostos por Pell & Schofield (1993) e Cone et al. (1995) são inteiramente automatizados, exigindo um transdutor de pressão para cada garrafa. Esse fato envolve muito equipamento eletrônico, além de limitar o número de garrafas por corrida (cerca de dezesseis). No método proposto por Theodorou et al. (1993), as leituras de pressão e volume são feitas manualmente. Esse método usa somente um transdutor de pressão, conectado a um amperímetro digital, o que permite ampliar o número de garrafas por

corrida em até 80. O objetivo desta publicação é divulgar a técnica de produção de gás proposta pelo Institute of Grassland and Environmental Research (IGER), UK, em função da experiência adquirida no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade de Guelph, Canadá, e do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

2 O MÉTODO DO IGER

Este método foi desenvolvido por um grupo de microbiologistas liderado pelo Dr. Michael K. Theodorou. De acordo com o manual publicado pelo IGER ("Manual for Gas Production Technique", by Alison Brooks & Michael K. Theodorou), as amostras moídas são incubadas em garrafas hermeticamente fechadas, mantidas a 39°C, com um meio anaeróbico, inoculado com líquido ruminal. Conforme a fermentação avança, o gás acumulado no espaço superior dessas garrafas é medido usando-se um transdutor de pressão conectado a uma válvula de três saídas. O valor desta pressão é mostrado em um amperímetro digital. Uma seringa, também acoplada a esta válvula, é utilizada para registrar e liberar o volume correspondente aos gases. As curvas de produção de gás são estabelecidas, repetindo-se as medidas e liberação dos gases, a intervalos regulares, durante o tempo total de incubação.

3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Banho-maria com temperatura controlada para operação contínua a 39°C.
- Kit para medir a produção de gás, fornecido pelo IGER, incluindo um transdutor de pressão destacável e um amperímetro digital para leitura. Endereço para pedido:

Microbiology group

IGER, Plas Gogerddam

Aberystwyth, Dyfed SY23 3EB, UK

Tel.: (1970) 828-255, R.2500 - Fax: (1970) 828-357

E-mail: mike.theodorou@bbsrc.ac.uk

- válvula de três saídas capaz de adaptar agulhas hipodérmicas 18G;
- garrafas de fermentação (vidro borosilicato), 125 ml, boca (DI X DE) 13mm x 20mm;
- lacres de alumínio para garrafas de fermentação com DE de 20 mm, topo aberto e sem revestimento;
- tampas de butileno para garrafas de fermentação com boca de 13mm x 20mm;
- seladores manuais para fixar lacres de alumínio em garrafas de fermentação de 20 mm de boca;
- seringas descartáveis de 5 ml, 20 ml e 60 ml.

4 REAGENTES

4.1 Preparo do meio de digestão

Quantidade = número de garrafas x 85 ml.

Adicionar os ingredientes na ordem indicada a seguir, permitindo a completa dissolução após cada adição:

- água destilada.....500 ml
- peptona (de digestão ácida de caseína).....0,2 g
- solução micromineral.....0,1 ml

- solução tampão.....200 ml
- solução macromineral..... 200 ml
- solução resazurina.....1 ml

4.2 Preparo das soluções

Todas as soluções devem ser guardadas no escuro, a uma temperatura de 4°C.

- Solução micromineral (gramas por 100 ml):

Cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	13,2
Cloreto de manganês diidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8,18
Cloreto de cobalto hexaidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1
Cloreto férrico (FeCl_3)	4,8

- Solução tampão (gramas por litro):

Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3)	4
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	35

- Solução macromineral (gramas por litro):

Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)	3,75
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	6,2
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,6

- Solução de resazurina (gramas por 100 ml):

Resazurina (indicador redox)	0,1
------------------------------------	-----

4.3 Preparo do agente redutor

Quantidade = número de garrafas x 5 ml.

- Solução nº 1:

Água destilada	47,5 ml
Cisteína clorohidrato	0,625 g
Hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M	4 ml

- Solução nº 2:

Água destilada47,5 ml
Sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)0,625 g

Imediatamente antes do seu uso e dentro de uma capela, transferir a solução nº 1 para uma garrafa limpa. Em seguida adicionar a solução nº 2. Tampar a garrafa rapidamente, agitando para misturar bem os componentes.

4.4 Preparo do inóculo de rúmen

Quantidade = número de garrafas x 5 ml.

O material do rúmen é retirado via fístula ruminal, espremido com as mãos, e o líquido ruminal coletado em um funil grande, revestido com lã de vidro e quatro camadas de gaze. O líquido filtrado é recolhido diretamente em uma garrafa térmica pré-aquecida (39°C), e imediatamente levado para o laboratório.

4.5 Marcha analítica

Dia 1: Pesar duas repetições de 0,5 grama de amostra de forrageira seca a 65°C , moída e passada em peneira de 1 milímetro, e transferir para garrafas de fermentação identificadas. Fechar as garrafas com as tampas de butileno, reservando três garrafas para controle (prova em branco).

Dia 2: No período da tarde, adicionar em cada garrafa 85 mililitros do **meio de digestão**, gaseificar com CO_2 , e fechar imediatamente. Na capela, adicionar rapidamente 5 mililitros do agente redutor e novamente gaseificar com CO_2 , tampando e, em seguida, selando com o lacre de alumínio. Verificar que a cor muda para rosa e logo começa a desaparecer, devagar, estando completa a redução quando a solução ficar incolor. Guardar as

garrafas em geladeira a 4°C durante a noite. Ligar o banho-maria (39°C) para pernoite.

Dia 3: Retirar as garrafas da geladeira e colocá-las em banho-maria (39°C), três horas antes do início da inoculação. Poucos minutos antes do tempo inicial de incubação, inocular cada garrafa com 5 mililitros de líquido ruminal, em ordem seqüencial, usando uma seringa de 5 mililitros acoplada a uma agulha 16G x 1,5 polegada. No exato tempo inicial de incubação, também em ordem seqüencial, zerar a pressão em todas as garrafas, usando o sistema de medição de pressão aberto, para a saída de gás. A partir deste momento, inicia-se o processo de fermentação, seguindo-se os horários das leituras previamente programados. Neste momento, cada garrafa deve conter 0,5 grama de amostra, 85 mililitros do meio de digestão, 5 mililitros do agente redutor e 5 mililitros de inóculo.

4.6 Medidas da pressão

- Conectar a válvula de três saídas ao transdutor de pressão e amperímetro digital. Fixar na saída de baixo desta válvula, uma agulha 23G x 1 polegada.

- Começar a leitura na mesma seqüência usada para inoculação, verificando que a torneira da válvula de três saídas esteja posicionada no sentido garrafa-transdutor de pressão.

- Inserir a agulha através da tampa de butileno no espaço vazio da garrafa e registrar a leitura obtida no amperímetro digital.

Nota: Registrar o maior valor primeiramente mostrado no visor.

- Dentro do menor tempo possível, fixar uma seringa plástica (60 ml, 20 ml ou 5 ml, dependendo do

valor da pressão obtida) na saída lateral da válvula de três saídas. Gira-se a torneira no sentido horário, mudando o fluxo de gás entre garrafa-seringa. Lentamente, puxar o êmbolo da seringa de forma a retirar o gás acumulado na garrafa. A leitura de pressão de gás também vai caindo. Continuar até que a mesma alcance 0,00 ($\pm 0,04$). Retirar em primeiro lugar a agulha da garrafa e retorná-la ao banho-maria. Em seguida, retirar a seringa da válvula de três saídas, registrar o volume de gás obtido, eliminando-o logo após em um ambiente ventilado.

Observação: Nunca esvaziar a seringa enquanto a mesma estiver fixada à válvula de três saídas, visto que este procedimento pode danificar a membrana do transdutor de pressão.

5 CÁLCULOS

Um programa para computador foi desenvolvido pelo Dr. Jan C. Plaizier (University of Guelph, Canadá), para calcular produção acumulativa de gás. Regressões lineares são determinadas para a pressão e volume de gás obtidos em cada um dos tempos de incubação para todas as repetições de amostras e provas em branco. Essa equação de regressão obtida é usada para calcular os volumes esperados de gás, correspondentes aos respectivos valores de pressão. Para cada amostra, o volume médio de gás é, inicialmente, corrigido pelo branco em cada tempo de incubação, e após, é calculado o volume médio de gás acumulado. Esses cálculos são efetuados usando-se um macro desenvolvido em Quattro Pro (® Borland. Inc.) versão 4.

Os componentes cinéticos da produção de gás podem ser estimados por regressões não-lineares do

tempo de incubação com o volume médio de gás acumulado calculado anteriormente, usando a equação logística de dois compartimentos propostos por Schofield et al. (1994). Esse procedimento de regressão não-linear é realizado pelo programa SAS (SAS, 1990).

Modelo:

$$V = A / (1 + \exp[2 + 4B(c-t)]) + D / (1 + \exp[2 + 4E(c-t)])$$

Onde:

V = volume de gás

T = tempo de incubação

A = volume de gás na fração rápida

B = taxa específica da fração rápida

C = tempo de espera ("Lag time")

D = volume de gás na fração lenta

E = taxa específica da fração lenta

Programa do SAS:

Title 'name of the experiment';

Options ls = 100;

Data one;

Infile 'name of the file with data';

Input id \$ time gascumm;

Proc sort; by id;

Proc nlin best = 6; by id;

Parms A = 60 to 100 by 10 B = 0.06 to 0.12 by 0.01 C = 0 to 10 by 1 D = 80 to 120 by 10 E = 0.01 to 0.05 by 0.01;

Model gascumm = A / (1 + exp(2 + 4 * B * (C - time))) + D / (1 + exp(2 + 4 * E * (C - time)));

Output out = plot predicted = ghat residual = resid;

Proc print; by id;

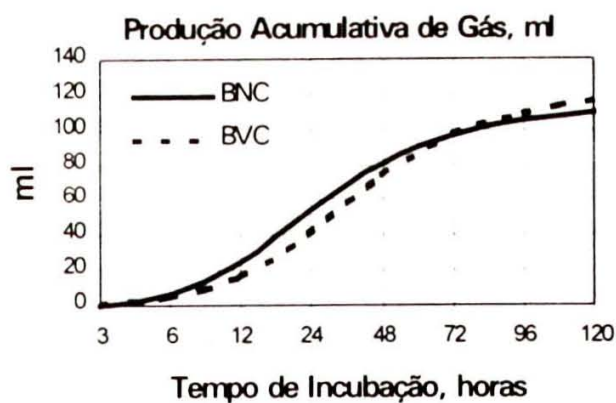
Var time gascumm ghat resid;

Run;

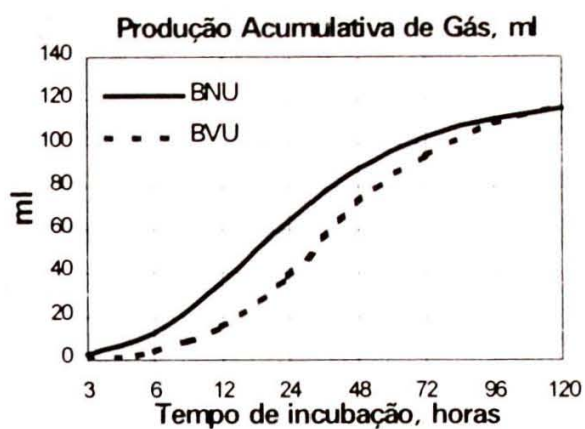
6 RESULTADOS

A significância biológica dos valores obtidos com a técnica da produção de gás é confirmada pela alta correlação linear encontrada entre o volume de gás produzido pela fermentação da matéria seca com a sua correspondente perda, em cada tempo de incubação (base resíduo permanente na garrafa de digestão), conforme resultados encontrados para gramíneas fenadas ou ensiladas (Thiago et al., 1997): feno: $y = 17,5 + 0,494x$, $R^2 = 0,99$; silagem: $y = 32,6 + 0,387x$, $R^2 = 0,97$.

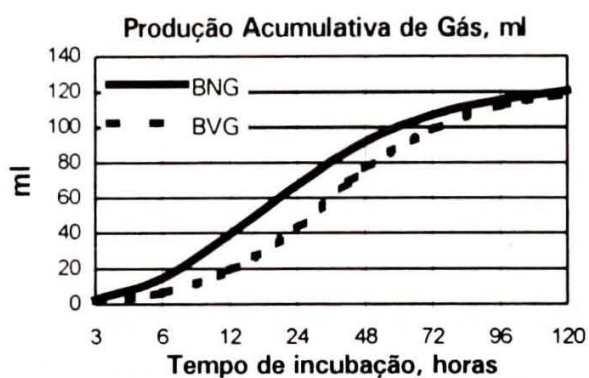
Para as forragens tropicais, em geral com altos teores de fibra em detergente neutro e baixos teores de proteína bruta, a composição do **meio de digestão** talvez não seja adequada para atender ao processo de fermentação, principalmente na sua fase inicial. Isto poderia reduzir as chances de serem detectadas possíveis diferenças qualitativas entre forragens. Com o objetivo de cobrir eventuais deficiências, foram adicionados ao **meio de digestão** nutrientes protéicos (0,0865 gramas de uréia/901 mililitros do meio de digestão) e energéticos (0,447 gramas de glicose/901 mililitros do meio de digestão). Os resultados mostraram que a adição isolada de cada nutriente contribuiu para aumentar as diferenças entre as taxas de degradação das duas forragens estudadas, embora sua adição em conjunto, aparentemente, não tenha produzido o mesmo efeito (Fig. 1). A adição de nutrientes, bem como mudanças na relação líquido ruminal e mistura tamponante, é área ainda não investigada e, potencialmente, interessante de ser modificada.



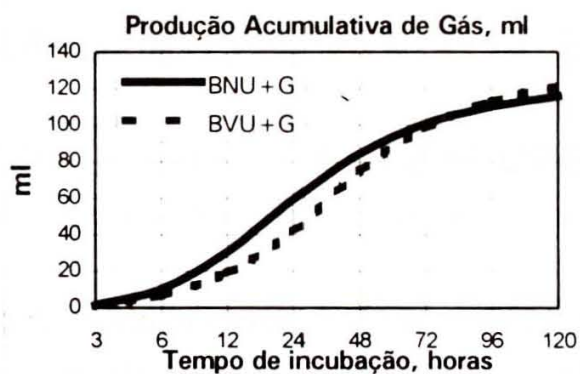
BNC = controle
BVC = controle



BNU = com uréia
BVU = com uréia



BNG = com glicose
BVG = com glicose



BNU + G = com uréia + glicose
BVU + G = com uréia + glicose

FIG. 1. Curvas acumulativas de produção de gás de *Brachiaria decumbens* nova (BN) e Madura (BV).

7 COMENTÁRIOS FINAIS

A técnica de produção de gás mede tanto a digestibilidade de uma forragem como os parâmetros cinéticos da digestão, baseada na liberação dos produtos de fermentação.

Trata-se de uma técnica simples, confiável e de baixo custo, tornando-a atrativa para qualquer laboratório envolvido em estudos qualitativos de forragem para ruminantes. A sua investigação envolve um animal fistulado e permite trabalhar-se com até 80 amostras por corrida. O seu potencial para uso na pesquisa com ruminantes é muito amplo, e a mesma vem despertando grandes interesses em muitos laboratórios espalhados pelo mundo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROOKS, A.; THEODOROU, M.K. Manual for gas production technique. Aberystwyth: IGER, [199-]. 7p.
- CONE, J.W.; BEUVINK, J.A.M.W.; RODRIGUES, M.A.M. Use and applications of an automated time related gas production test for the in vitro study of fermentation kinetics in the rumen. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, Anal, n.1, p.25-36, 1995.

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; SLEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHENEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas productions when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.93, n.1, p.217-222, Aug. 1979.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.6, n.5, p.1063-1073, May 1993.

SAS Institute (Cary, USA). **SAS language reference**. Cary, 1990. 1042p.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, n.11, p.290-291, Nov. 1994.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J.A. A new gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, n.3-4, p.185-197, Aug. 1993.

THIAGO, L.R.L.S.; COLUCCI, P.; PLAIZIER, J.C; IGHE, A.; MURPHY, A.; FEIJÓ, G.L.D. Produção de gás: uma alternativa para digestibilidade in vitro. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.100-101.



Embrapa

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte
Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

Rodovia BR 262, km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS
Telefone (067) 768 2064 Fax (067) 763 2700
e-mail: difusao@cnpge.embrapa.br

ISBN 85-297-0044-9

